

KANDUNGAN ASAM ASKORBAT PADA KULTUR KALUS ROSELA (*Hibiscus sabdariffa* L.) DENGAN VARIASI KONSENTRASI SUKROSA DALAM MEDIA MS

ASCORBIC ACID CONTENT ON *Hibiscus sabdariffa* L. CALLUS AT VARIOUS CONCENTRATION OF SUCROSE IN MS MEDIA

Yulita Nurchayati*) dan Fathiyah Afiah R
Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang

ABSTRAK

Asam askorbat merupakan salah satu antioksidan yang dijumpai dalam kelopak bunga rosela. Produksinya secara konvensional memerlukan waktu dan lahan yang luas, sehingga diperlukan metode alternatif menggunakan pembentukan kalus secara *in vitro*. Sukrosa berperan sebagai sumber karbon utama dalam medium MS, selain itu dapat berperan sebagai prezat pembentukan asam askorbat. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penambahan sukrosa dalam pembentukan kalus dan produksi asam askorbat. Perlakuan yang diberikan adalah beberapa konsentrasi sukrosa yaitu 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L dan 50 g/L dalam medium kultur. Kultur diinkubasi selama 42 hari dengan subkultur 2 kali setiap 10 hari sekali. Analisis kandungan asam askorbat dilakukan dengan metode titrasi iodometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus terbentuk paling cepat pada penambahan sukrosa 20 g/L sedangkan kandungan asam askorbat tertinggi diperoleh pada kalus dengan penambahan sukrosa 50 g/L.

Kata kunci : kalus rosela, asam askorbat, sukrosa

ABSTRAK

Ascorbic acid is an antioxidant which is found in rosella flower. Its production through conventional method needs long time and wide field, so an alternative method through development of callus *in vitro* is conducted. Sucrose is a main carbon source in MS medium and this sugar plays role as precursor for the formation of ascorbic acid. This study was conducted to determine the effect of sucrose concentration on callus formation and production of ascorbic acid. Sucrose was added to the media at the concentration of 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L and 50 g/L. The culture was incubated for 42 days with twice subculture every 10 days. Analysis of ascorbic acid was performed using iodometry. The results showed that the callus was grow better in sucrose of 20 g/L while the ascorbic acid production was better in sucrose 50 g/L.

Key words : rosella callus, ascorbic acid, sucrose

PENDAHULUAN

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan tanaman tropis anggota familia Malvaceae yang memiliki kelopak bunga yang berwarna merah, yang mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat oksidasi radikal bebas (Mardiah, 2009). Antioksidan yang melimpah dalam kelopak bunga rosela tersebut adalah asam askorbat. Kebutuhan antioksidan dari kelopak

bunga memerlukan bahan baku yang sangat banyak. Oleh karena itu, diperlukan metode yang lebih efisien untuk produksi metabolit sekunder tumbuhan, seperti asam askorbat, melalui teknik kultur jaringan. Salah satu teknik kultur jaringan yang memungkinkan digunakan untuk produksi asam askorbat adalah melalui pengembangan teknik induksi kalus. Kalus merupakan jaringan non diferensiatif yang terbentuk dari organ yang dilukai dan ditumbuhkan dalam medium secara *in vitro*. Komponen utama dari medium kultur adalah mineral dan gula sebagai sumber karbon utama. Umumnya gula yang diberikan ke dalam medium MS adalah berupa sukrosa (Torres, 1989).

*Korespondensi : Yulita Nurchayati
Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang
email: yulita.yoko@gmail.com

Sukrosa dalam medium kultur juga dapat digunakan sebagai prazat pembentukan metabolit sekunder asam askorbat, karena vitamin C pada tumbuhan terbentuk dari glukosa melalui jalur asam D-glukoronat dan L-gulonat (Manitto,1981). Hasil penelitian melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi sukrosa dapat meningkatkan produksi alkaloida pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (Carew dan Krueger, 1977; Sumardi,2001). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji peran sukrosa terhadap pembentukan kalus dan mengetahui kandungan vitamin C dari kalus yang terbentuk.

METODOLOGI

Inisiasi kultur

Eksplan berupa daun rosela urutan ke 3 dari pucuk dicuci dengan air mengalir dan detergen, kemudian disterilisasi dengan larutan NaHipoklorit 10% selama 5 menit dan dibilas dengan akuades steril. Eksplan dibilas dengan alkohol 70% beberapa menit selanjutnya ditanam dalam botol kultur. Medium yang digunakan adalah medium MS yang diberi zpt NAA 2 ppm dan BAP 3 ppm dan penambahan sukrosa 20 g/L,30 g/L,40 g/L, 50 g/L, serta 1 perlakuan tanpa diberi sukrosa.

Kultur dipelihara dengan melakukan subkultur setiap 10 hari sekali. Kalus yang tumbuh hasil subkultur yang ke-2 dipanen.

Analisis kandungan vitamin C kalus dengan metode titrasi iodometri

Kalus hasil dari tiap perlakuan sukrosa diekstraksi dengan akuades, hasilnya kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL. Akuades ditambahkan ke dalam labu ukur tersebut sampai volume mencapai 50 mL, lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat sebanyak 10 mL dimasukkan dalam labu Erlenmeyer 125 mL, kemudian ditambahkan 2 mL larutan amilum 1%. Larutan tersebut selanjutnya dititrasi dengan larutan iodin standar standar 0,01 N sampai larutan berubah warna menjadi biru. Kandungan asam askorbat dalam kalus ditentukan dengan menggunakan rumus sbb:

$$\text{Kandungan Vit.C} : \frac{50}{10} \times 0,88 \times b$$

A

Keterangan :

b: volume rata-rata hasil titrasi (mL)

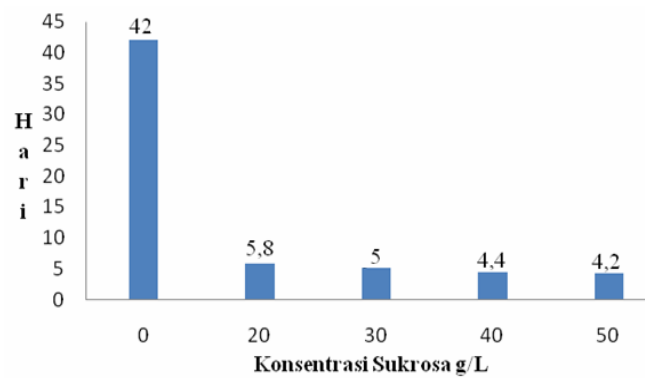
A: Berat Sampel (g). Sudarmaji (1989)

HASIL DAN PEMBAHASAN

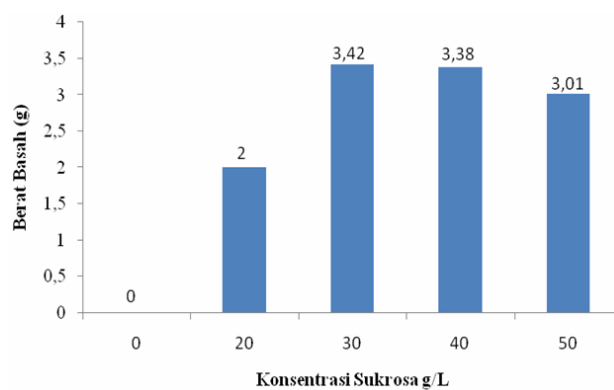
Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun rosela mampu mengalami dediferensiasi menjadi kalus pada medium MS yang mengandung kombinasi zpt yang sama NAA 2 ppm dan BAP 3 ppm. Penambahan sukrosa ke dalam medium MS memberikan pengaruh secara signifikan. Inkubasi kultur selama 42 hari cukup memberikan gambaran respon eksplan terhadap penambahan sukrosa dalam medium.

Histogram pada Gambar 1 menunjukkan bahwa eksplan berupa daun rosela memberikan respon terhadap medium MS yang mengandung NAA dan BAP serta penambahan sukrosa. Kalus terbentuk paling cepat terjadi pada perlakuan konsentrasi sukrosa 40g/L dan 50 g/L yaitu pada hari ke 4. Penambahan sukrosa sebanyak 20 g/L maupun 30g/L memberikan efek lebih lambat daripada perlakuan sebelumnya yaitu pada hari ke 5. Hal ini membuktikan bahwa selain zpt, sukrosa pada konsentrasi tinggi (lebih dari 30 g/L) diperlukan untuk menginduksi kalus pada jaringan secara in vitro. Media tanpa penambahan sukrosa (0 g/L atau kontrol) hingga akhir penelitian tidak terjadi inisiasi kalus. Hal ini menunjukkan bahwa sukrosa sangat mutlak diperlukan untuk memacu inisiasi kalus. Medium MS yang mengandung garam mineral, zpt dan vitamin ternyata tidak mampu menginduksi kalogenesis pada daun rosela. Eksplan pada perlakuan control hanya membengkak tetapi tidak menghasilkan kalus pada permukaannya.

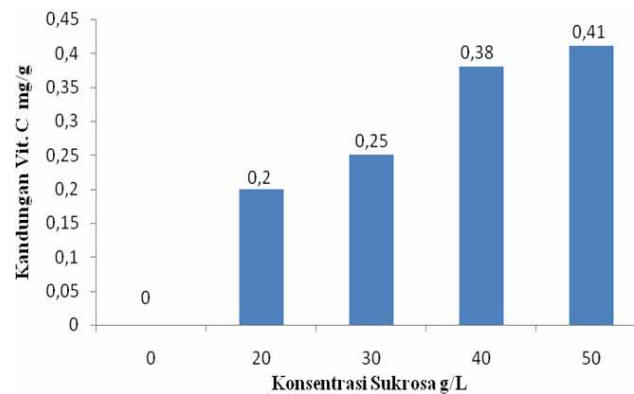
Efek penambahan sukrosa juga tampak dari berat basah kalus. Medium MS yang mengandung sukrosa 30g/L menghasilkan rata-rata berat basah tertinggi, meskipun perbedaan yang terjadi tidak signifikan (Gambar 2). Sukrosa dengan konsentrasi lebih tinggi dari komposisi normal medium MS justru menunjukkan penurunan berat basah kalus. Hal ini disebabkan konsentrasi medium menjadi lebih pekat dan menghambat penyerapan air maupun garam mineral yang ada. Peristiwa penghambatan penyerapan air tersebut lebih tampak pada penambahan sukrosa 50 g/L. Dapat diduga bahwa penambahan sukrosa lebih dari konsentrasi normal akan menghambat pertumbuhan jaringan secara in vitro. Namun demikian menurut Mareztki (1984) respon pertumbuhan sel terhadap penambahan karbohidrat setiap spesies berbeda.



Gambar 1. Histogram waktu inisiasi terbentuknya kalus *Hibiscus sabdariffa* L.



Gambar 2. Histogram berat basah kalus (g) *H. sabdariffa* L.



Gambar 3. Histogram kandungan vitamin C kalus *Hibiscus sabdariffa* L pada pemberian konsentrasi sukrosa berbeda.

Produksi asam askorbat dalam kalus

Konsentrasi sukrosa yang tinggi diserap sel-sel kalus selain untuk pertumbuhan juga digunakan untuk membentuk metabolit sekunder. Menurut Jang dan Sheen (1997) dalam Merrilon dan Ramawat (1999) gula dalam pembentukan metabolit sekunder, gula digunakan sebagai

sumber energi, sumber karbon, dan untuk mengatur sinyal yang mempengaruhi ekspresi gen dalam proses pembentukan metabolit sekunder.

Hasil analisis kandungan asam askorbat dalam kalus rosella tampak bahwa pada medium tanpa sukrosa tidak terdeteksi karena tidak menghasilkan kalus sama sekali (Gambar 3).

Penambahan sukrosa yang rendah (20 g/L) sudah menunjukkan adanya kandungan asam askorbat. Siring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan dalam medium ternyata menunjukkan peningkatan kandungan asam askorbat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam askorbat tertinggi dari kalus *Hibiscus sabdariffa* L diperoleh dari perlakuan konsentrasi sukrosa 50 g/L sebanyak 0,41mg/g. Hasil tersebut tidak berbeda secara signifikan dengan perlakuan konsentrasi 40 g/L, yaitu berkisar 0.38-0.41 mg/g.

Menurut Jang dan Sheen (1997) dalam Merrillon dan Ramawat (1999) gula dalam medium kultur untuk tujuan produksi metabolit sekunder memiliki 3 peran, yaitu sebagai sumber energi, sumber karbon, dan untuk mengatur sinyal yang mempengaruhi ekspresi gen dalam proses pembentukan metabolit sekunder. Dicosmo (1989) menyatakan bahwa sumber karbon dapat menginduksi pembentukan metabolit sekunder dan pada konsentrasi yang tinggi karbohidrat dapat mempertahankan metabolisme sekunder. Dalam sel tumbuhan, karbohidrat dapat mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui glikolisis dan daur Krebs. Kedua jalur tersebut menjadi sumber energi dalam pembentukan metabolit sekunder (Ramawat, 1999). Sukrosa dalam medium kultur mengalami hidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa yang terbentuk selanjutnya akan masuk ke dalam jalur asam D-glukoronat dan L-gulonat untuk membentuk asam askorbat (Manitto, 1981). Peningkatan konsentrasi sukrosa tampak mampu mempengaruhi kandungan asam askorbat di dalam kalus *Hibiscus sabdariffa* L.

KESIMPULAN

Penambahan sukrosa dalam media MS mampu mempercepat waktu inisiasi dan mempengaruhi pembentukan kalus. Konsentrasi sukrosa yang tinggi menghasilkan kandungan asam askorbat tertinggi pada kalus rosela.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada Nintya Setiari, MSi atas kerjasama yang telah diberikan dalam melakukan penelitian hingga analisis asam askorbat dan penentuan kriteria kalus yang terbentuk.

DAFTAR PUSTAKA

- Allan, E. 1991. *Plant cell and Tissue Culture of Higher Plant*. Kluwer Academic Publisher. London.
- Amelia, L & Hardiyadi. 1999. *Upaya Mikropopagasi Tanaman Melon (Cucumis melo L) dengan Penambahan ZPT sitokinin*. Biosfera Vol 12: 29-37 Hal:29-36
- Carew, D.P. and Krueger, R.J. 1977. *Catharanthus roseus Tissue Culture: The Effect Medium Modification on Growth and Alkaloid Production*. J. Nat. Prod. 40:326-336
- Damasco, o.P and R. C Barba. 1984. *Invitro Culture of Saba Banana (Musa sp.cv. Saba)* Phil. Agr, 67,351-358
- Gamborg, O. L & G. C Phillips. 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. German
- Giovannoni, J. J. 2007. *Completing a Pathway to plant Vitamin Synthesis*. The National Academy of Sciences of the USA. *PNAS journal* 104:9190-9110
- Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. Terjemahan : Koensoemardiyah. IKIP Semarang Press. Semarang
- Maretzki, A., M. Thom, L.G. Nickell. 1974. *Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus culture*. In Street, H.E. (ed). *Tissue Culture and Plant Science*. London: Academic Press Inc.
- Maryani, H dan Kristiana, L. 2005. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. PT Agromedia Pustaka. Jakarta
- Merrillon, J. M. and K.G. Ramawat, 1999. *Mechanism and control*. In. Ramawat, K. G and J .M. Merillon (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. New Hampshire: Science Publisher, Inc.
- Ramawat, K.G. 1999. *Production in culture: optimization*. In Ramawat, K.G. and J.M. Merillon. (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. New Hampshire: Science Publisher, Inc.
- Smirnoff, N. 1996. *The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants*. *Annals of Botany* 78:661-669.